R. UNIVERSITÀ DI PISA

ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE

E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA

R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

129

M. VALLEGGI

SU LA CONCIMAZIONE DEI BATTERI CON ZOLFO

Estratto dal *Bollettino del R. Istit. Sup. Agrario di Pisa*

Volume XII - 1936 - XV.

PREMIATO STABILIMENTO TIPOGRAFICO G. CURSI & FIGLI - 1936 XV

M. VALLEGGI

SU LA CONCIMAZIONE DEI BATTERI CON ZOLFO

È indagata l'azione dello S sullo sviluppo dei microrganismi terricoli e sullo svolgimento delle loro attività: mobilizzazione dell'azoto, produzione di CO_2, solubilizzazione degli elementi minerali. Infine, sono riportati alcuni reperti colturali.

PREMESSA

I progressi realizzati in questi ultimi anni dalla Batteriologia applicata alla Biologia del terreno e tutti compendiati nei dettami della teoria microrganica della concimazione ([69]), hanno suggerito una nuova distinzione nella categoria di quelle sostanze che vengono impiegate nella pratica agricola sotto il nome generico di *concimi.*

Infatti, nel linguaggio comune, vanno sotto questa denominazione anche delle sostanze nella cui composizione gli elementi indispensabili alla nutrizione vegetale rientrano in quantità così trascurabili – quando non manchino del tutto – sì da potere escludere a priori che esse contribuiscano direttamente all'alimentazione della pianta e che, per la loro natura, non sempre influiscono profondamente su lo stato fisico del terreno esercitando, invece, la loro azione sul suo contenuto microrganico. Tali materiali, organici od inorganici, debbono essere denominati "concimi per i batteri„: fra essi rientra appunto lo zolfo allorchè venga incorporato nel terreno agrario ([83]).

Un cenno sull'uso dello zolfo in Agricoltura lo troviamo anche in Filippo Re ([1]), il quale ricorda che Guatieri *(Note del prospetto dei concimi europei)* incluse questo materiale fra i concimi e Giobert *(Ricerche sugli ingrassi),* sulla scorta di esperienze proprie, fu indotto a credere che esso riuscisse utile non tanto come ingrasso vero e proprio, quanto per la sua proprietà di tenere lontani dalle piante alcuni insetti.

La sperimentazione relativa all' impiego dello zolfo come fertilizzante, al suo meccanismo di evoluzione in mezzi terrosi ed al significato biologico che può avere nel metabolismo vegetale, conta una vasta bibliografia; di questa saranno passate in breve rassegna le voci più interessanti.

Circa l' importanza dello zolfo quale costituente del terreno agrario e la parte che esso ha nel chimismo della pianta, BERTRAND e SILBERSTEIN ([75]), dai reperti analitici di numerosi campioni, rilevano che le terre più ricche di zolfo sono fra le più fertili, e, osservando che questo elemento fa parte della molecola delle sostanze proteiche, mettono in evidenza la necessità di riparare alle sue insufficienze nello stesso modo con cui si ripara a quelle di azoto, anidride fosforica e potassa. NICOLAS ([53]) conclude favorevolmente riguardo all' azione dello zolfo sull' assimilazione da parte delle piante dell' azoto contenuto nel terreno e sull' organizzazione del carbonio atmosferico, mentre WARBURG ([68]) trova un' accelerazione nella formazione dei grassi e nell' ossidazione delle proteine per le piante coltivate in terreni trattati con la sostanza in questione.

Hanno ottenuto aumenti più o meno sensibili di produzione con l'aggiunta di moderate dosi di zolfo – da Q.li 0,5 a Q.li 3 per Ha – BERNHARD ([5]), CHANGRIN e DESTRIOT ([6]), SABASCHNIKOFF ([8]), BOULLANGER e DUGARDIN ([8-10]), SHEDD ([21]), DEMOLON ([11]), MANARESI ([14]), TRITSCHLER ([15]), BOSINELLI ([26]), D'IPPOLITO ([64]), REINER e TARTAR ([43]), JOFFE e Mc. LEAN ([59]), POWERS ([70]), LA ROTONDA ([81]); non ritengono invece opportuna quest' aggiunta, trovandola dannosa, PFEIFFER, BLANCK e SIMMERMACHER ([22—29]), FEILITZEN ([16]), THALAU ([17]), HART e TOTTINGHAM ([25]), O'GARA ([45]), PITZ ([32]).

Fin dal 1869 MARES mise in evidenza che lo zolfo subisce nel terreno un processo ossidativo per il quale esso da origine ad acido solforico: dopo di lui le ricerche su questa trasformazione hanno richiamato l' attenzione di numerosi studiosi.

DYMOND, HUGHES e JUPE ([4]), HART, PETERSON e TOTTINGHAN ([7—25]), AMES e BOLTZ ([33]), ROBINSON ([23]), ritengono che non sempre il terreno contenga sufficienti dosi di zolfo assimilabile dalle piante e che esso, una volta passato ad acido solforico, si renda utile a queste nello stesso modo con cui si rendono

utili, quali portatori di zolfo, il solfato ammonico ed il gesso: qualcuno dei suddetti AA. suppone anche che l'azione dello zolfo sia di carattere oligodinamico. KAPPEN e QUENSELL ([27]) riscontrano che l'ossidazione è molto più intensa per lo zolfo precipitato che per quello rombico, in ciò concordando con BORDAS ([76]) il quale riferisce di alcune esperienze eseguite presso la Stazione Agricola di Avignone su cavoli, patate e melanzane impiegando zolfo di finezza infinitesimale.

La ragione del fatto risiederebbe nella possibilità di una distribuzione più uniforme e quindi nella maggior superficie di contatto del materiale con gli agenti della sua evoluzione.

SHEDD ([24]) trova l'ossidazione più facile in un terreno fertile piuttosto che in uno povero o sabbioso; al contrario LINT CLAY ([24]) la constata più rapida nella sabbia.

LIPMANN ([34]), HIBBARD ([57]), RUDOLFS ([60]) consigliano lo zolfo come correttivo dei terreni alcalini. Recentemente, a questo proposito, WEBBER (*) ([84]) illustra i lusinghieri risultati ottenuti sull'erba medica somministrando zolfo ad un terreno "black alkali" della California; risultati che si riportano in parte a quelli avuti sulla stessa pianta da JOFFE e MC.LEAN ([59]), i quali osservano appunto che i terreni nei quali lo zolfo determina un notevole aumento di raccolto sono quelli capaci di neutralizzare l'acidità prodottasi e che non subiscono modificazioni nella reazione dopo aver ossidato tre quintali di zolfo per Ha.

MC. LEAN ha anche ricercato con esito favorevole la possibilità di esaltare il processo ossidativo con alcuni catalizzatori, quali il solfato ferroso ed il solfato di alluminio, mentre DEMOLON ([79]) ritiene che questo processo sia pressochè completo dopo due o tre mesi per un quantitativo aggirantesi sui 3 Q.li e secondo le condizioni di umidità dell'ambiente. Infine, BRIOUX e GUERBET ([48—49]) asseri-

(*) – Due parcelle di terreno "black alkali" (California), nel 1923, furono ugualmente ben drenate e lisciviate, incorporando in una di esse, prima della lisciviazione, zolfo in misura di 2 tonn. per acre. Nel 1926 la parcella non trattata aveva pochissimi e stentati getti di erba medica, mentre quella trattata dette una produzione di tonn. 12,2, che salì a tonn. 18,8 nel 1927.

scono che la trasformazione dello zolfo è favorita dalla presenza di carbonato di calcio e ritardata da quella degli idrati di carbonio, i quali anche secondo Brown e Kellog ([28]) riuscirebbero tanto più ostacolanti quanto maggiormente sono solubili.

Su l' azione dissolvente nei riguardi di alcuni biogeni legati in combinazioni insolubili, la quasi totalità degli AA. è concorde nell' attribuire allo zolfo un' efficacia più o meno notevole, quando esso trovi le condizioni adatte ad una completa ossidazione. Demolon ([11]) opina che l' acido solforico generatosi possa esercitare il suo potere solvente tanto direttamente quanto indirettamente con la formazione di solfato di calcio il quale sposta la potassa; e Rudolfs ([60]), usando una mescolanza di terra, zolfo, sabbia e solfato ammonico, constata la solubilizzazione di una non lieve proporzione di potassa, non trovando invece opportuna l'aggiunta di fosfati greggi e zolfo, perchè l'acidità da questo prodotta riesce nociva alle piante senza solubilizzare apprezzabili quantità di anidride fosforica. Schroeder ([35]) suggerisce l' impiego dell' anidride solforosa per mobilizzare la potassa leucitica, mentre Mc. Call e Smith ([48]), Ames e Boltz ([44]), Shedd ([71]), La Rotonda ([84]) confermano l'utilità di associare lo zolfo alla leucite.

Per la dissoluzione dell' anidride fosforica dalle fosforiti mescolate al terreno od a composte di letame, unitamente a variabili quantitativi di zolfo, ebbero costantemente reperti positivi Lipmann, Mc. Lean, Lint, Joffe, Blair, Martin, Beekwiht, Selmann Waksmann ([37—38—49—55—61—66]), Shedd ([50]), Ames, Richmond, Boltz, Brown, Warner, Groinn ([39—40]), Ellet e Harris ([51]) Reiner e Tartar ([43]), Avanzi ([46]).

Che l' ossidazione dello zolfo sia prevalentemente da attribuire ad attività microrganica anzichè ad un semplice fenomeno chimico è convinzione largamente condivisa da tutti coloro che si sono occupati d' indagare in qual modo essa possa avvenire.

Boullanger, Dugardin ([9-10]) e Demolon ([11]) constatano un' ossidazione ridottissima nei terreni sterilizzati, Mc. Lean ([42]) e Drewes ([77]) assegnano un valore preminente al fenomeno microbiologico, Jacobsen ([12]), Lieske ([13]), Beyerinck ([3]), Nathanson ([2]), affermano che lo zolfo elementare e le sue combina-

zioni incompletamente ossidate (iposolfiti, tionati) sono trasformati in solfati da alcune specie nettamente autotrofe. LIPMANN, WAKSMANN, JOFFE, STARKEY, GEHRING ([31—34—54—56—62—63—65]) pongono in evidenza la notevole importanza agronomica che spetta alla trasformazione biochimica dello zolfo nel terreno, studiando diversi microrganismi terricoli specificamente attivi nei riguardi dell' idrogeno solforato, iposolfiti e solfuri (solfobatteri ossidanti). WAKSMANN e JOFFE isolarono da terreno trattato con zolfo anche una forma denominata *Thiobacillus thioxidans*, la quale utilizza l'anidride carbonica dell' aria al pari dei solfobatteri ossidanti, differenziandosi però da questi per essere attivissima su lo zolfo elementare anzichè sui tiosolfati, del tutto inattiva sull' idrogeno solforato ed i solfuri e per la caratteristica di tollerare e produrre un'acidità a cui pochissimi altri organismi si adattano (pH 2-3) ([82]).

Questi ultimi due AA. ammettono però che esistano nel terreno moltissime altre specie di microrganismi capaci di ossidare piccole quantità di zolfo, specie delle quali resta a sapere se siano eterotrofe, come alcuni pretendono, o se appartengano ad uno dei tre gruppi dei solfobatteri. D'altra parte DEMOLON ([11]) e KIPPEL ([67]) osservano che certe specie eterotrofe del terreno sono molto attive sullo zolfo e che quindi è molto probabile il loro intervento nel metabolismo di questo elemento allorchè è incorporato nel terreno: inoltre la sensibilissima e favorevole azione esercitata dalla presenza della sostanza organica azotata sul processo evolutivo dello zolfo e che trova riscontro nelle osservazioni di molti altri studiosi (BOULLANGER e DUGARDIN ([10]), BRIOUX e GUERBERT ([18—19]), BROWN e KELLOG ([28]), VERMOREL e DANTHONY ([20]), PFEIFFER e SIMMERMACHER ([29]) ZOLLA ([30]), STEWART ([52]), OPARO ([36]), CHAUZIT ([47]), BOSINELLI ([26]), AVANZI ([46]), GUITONNEAU ([78]), autorizza largamente la supposizione che i microbi della putrefazione non siano del tutto estranei a questo processo.

Degno di particolare rilievo è il contributo portato su questo punto dal citato GUITONNEAU, il quale ritiene che in un terreno ricco di azoto organico e bene aereato, la trasformazione dello zolfo possa dipendere da un fenomeno molto complesso di natura microbica che fa apparire prima dei solfati alcuni composti dello zolfo solubili ed ossidabili fra i quali sono stati rinvenuti gli

iposolfiti. Lo stesso A. ha osservato che in un mezzo artificiale ben dotato di azoto organico e privo di nitrati l'ossidazione completa può essere ottenuta abbastanza rapidamente mercè il successivo intervento di due forme microbiche, di cui una (ammonizzante) porta lo zolfo allo stato di iposolfiti e l'altra (più o meno strettamente autotrofa) traforma questi in solfati. Fra i microbi ammonizzanti trova essere molto attivi: *B. subtilis, B. mesentericus, B. megatherium, B. mycoides, Bct. coli, Act. griseus;* e conclude rilevando che tra il ciclo evolutivo dell' azoto e quello dello zolfo elementare nel terreno esistono relazioni abbastanza strette, non essendo difficile provare una notevole e reciproca influenza dell' uno sull' altro.

Se, dunque, non vi possono essere dubbi sulla fondamentate importanza che ha l' intervento dei microrganismi nella trasformazione dello zolfo aggiunto al terreno, resta ancora molto oscuro il meccanismo di tale intervento per quanto si riferisce alla parte che in esso hanno le forma autotrofe nei confronti di quelle eterotrofe.

Riguardo all' influenza dello zolfo sulla microflora terricola, si ritiene che esso provochi una contrazione nella sua entità secondo Demolon ([14]), Bernhard ([5]) Pitz ([32]), ed un leggero aumento secondo O' Gara ([45]). Nell' ammonizzazione si avrebbe un' esaltazione per Bosinelli ([26]), Boullanger e Dugardin ([10]) Lipmann, Prince e Blair ([58]), e Fife ([73]); parere questo non condiviso da Brioux e Guerbet ([18—19]), mentre Ames e Richond ([41]) sostengono che nei terreni poveri di basi il vantaggio in favore di questo processo è del tutto indiretto, per l' accumulo di ammoniaca che si verifica in seguito alla difficoltà con cui avviene la sua ossidazione.

Boullanger e Dugardin ([10]) riscontrano che lo zolfo in piccole quantità non ha azione dannosa verso i batteri della nitrificazione; opinione sostenuta anche da Lipmann, Prince e Blair ([58]) – i quali, come del resto Boullanger e Dugardin, sperimentarono lo zolfo in presenza di concime completo (letame) – ma avversate da Pitz ([32]) Richmond, Ames e Boltz ([41—44]), gli ultimi due osservando anche che lo zolfo può esercitare opera deletaria sui nitrificanti non soltanto in terreno acido ma anche in terreno alcalino.

Guitonneau ([74]) dimostra che nei terreni dove si somministra zolfo, la nitrificazione viene ad essere più o meno depressa e che essa riprende il suo tono normale dopo 60 giorni, se sono scomparsi i prodotti di solubilizzazione dello zolfo. Per quanto riguarda l'effetto dei diversi composti di questo elemento, l'A. ha sperimentalmente constatato che, qualora esso si trasformi presto in solfati, la nitrificazione non è arrestata o quasi, cosa che invece avviene in presenza di iposolfiti.

Infine, Fife ([73]) trova un' attivazione del processo in parola nei terreni a forti dosi di sostanza organica ed un rapidissimo avvelenamento in quelli a scarso suo contenuto.

Nessuna influenza su gli azotobatteri è stata rilevata da Boullanger e Dugardin ([40]) e da Fife ([73]).

Parte Sperimentale

I. – *Influenza dello zolfo su la microflora.*

A – Constatata preliminarmente l' inopportunità di aggiungere direttamente lo zolfo all'agar per la insufficiente omogeneizzazione di quello con questo, furono allestite cinque Erlenmeyer da 500 c.c. con 250 c.c. di brodo di fagiuoli per ciascuna, a quattro di esse aggiungendo zolfo, rispettivamente, nelle proporzioni di 0,25-0,5-0,75 e 1 %, dopo sterilizzazione in corrente di vapore. Inoculate con 0,1 cc. di stemperamento 1 terra 1 acqua, le beute vennero collocate in termostato a 25°C.

Al settimo giorno stemperai 1 c.c. di ciascun liquido colturale con zolfo e di quello lasciato per controllo in altrettante Erlenmeyer contenenti 1000 cc. di acqua sterile e preparai 5 serie di colture a piatto – ciascuna in quadruplo – usando come substrato l' agar-fagiuoli ed insemenzando ogni piastra con 0,1 cc. degli stemperamenti corrispondenti.

Dopo 4 giorni di termostato a 25° C. constatai uno sviluppo abbastanza considerevole; all' ottavo giorno procedetti alle conte, i cui risultati sono riportati nella Tabella I.

È molto evidente l' azione ostacolante esercitata dallo zolfo sullo sviluppo dei microrganismi, ove esso venga aggiunto, anche in modeste proporzioni, a substrati privi di sostanze atte a neutralizzare l' acidità od eliminare sostanze nocive che da esso si formino.

B – Volendo apprezzare più da vicino l' azione dello zolfo su gli ifomiceti, preparai 30 Erlenmeyer da 250 c.c. con 100 c.c. ciascuna di infuso di fagiuoli saccarato al 20 ‰, lasciandone quattro tal quali ed aggiungendo alle altre, quattro a quattro, le medesime proporzioni di zolfo della prova precedente.

Le forme cimentate furono, *Penicillium glaucum, Aspergillus niger, Rhizopus nigricans* e *Trichothecium roseum.*

TABELLA I

Coltura	N° colonie per piastra	Media
Controllo	900 1100 1200 1000	1050
Zolfo 0,25 %	200 200 130 180	177
„ 0,50 %	290 250 320 240	275
„ 0,75 %	285 250 260 265	265
„ 1 %	80 90 85 90	86

Dopo 15 giorni di coltivazione in termostato a 25°C., le membrane fungine vennero estratte dalle beute, essiccate a 110° C. e pesate.

TABELLA II.

Colture		Forme cimentate e peso delle loro membrane			
		Penicillium	*Aspergillus*	*Rhizopus*	*Trichothecium*
Controllo		gr. 0,296	gr. 0,329	gr. 0,190	gr. 0,220
Zolfo	0,25 %	» 0,203	» 0,189	» 0,165	» 0,215
«	0,50 %	» 0,171	» 0,120	» 0,160	» 0,185
«	0,75 %	» 0,166	» 0,105	» 0,155	» 0,170
«	1 %	» 0,097	» 0,095	» 0,133	» 0,130

L'aumento in acidità del mezzo, conseguente all'evoluzione dello zolfo verso una forma di combinazione idrogenata o più o meno ossigenata, per opera anche degli stessi funghi – in questo caso non potendosi ammettere un intervento microbico diverso per la sterilizzazione subita da tutti i liquidi colturali – limita lo sviluppo delle membrane in modo del tutto proporzionale alla quantità dell'elemento.

II. – *Influenza su le attività microbiochimiche.*

Per queste ricerche impiegai i metodi di indagine consigliati dal Prof. PEROTTI *(Tecnica di Biologia Vegetale applicata all'Agricoltura, pagg. 442-445)* aggiungendo ai liquidi colturali di base, zolfo in diverse proporzioni e inoculando i liquidi sterili con terra del podere sperimentale (*).

(*) – Le soluzioni vennero sempre preparate con acqua distillata. Lo zolfo fu addizionato alle soluzioni dopo la sterilizzazione in autoclave, allo scopo di escludere una trasformazione del suo stato fisico per azione di un'elevata temperatura. Per l'ammonizzazione impiegai 40 beutine da 100 c.c. contenenti ognuna 50 c.c. di soluzione peptone 1,5 %. Al momento della distillazione suMgO, prelevai da ciascuna beutina 20 c.c. di liquido su cui determinai l'ammoniaca.

TABELLA III – A. – Ammonizzazione

Colture	Grammi di NH_3 per litro di liquido colturale (peptone Witte 1,5 %)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	Media
Controllo	0,255	0,289	0,272	0,340	0,310	0,361	0,293	0,327	*0,306*
Zolfo 0,25 %	0,340	0,337	0,360	0,357	0,327	0,429	0,310	0,327	*0,349*
„ 0,50 %	0,493	0,476	0,459	0,446	0,548	0,463	0,480	—	*0,480*
„ 0,75 %	0,442	0,442	0,425	0,493	0,344	0,480	0,361	0,395	*0,423*
„ 1 %	0,295	0,303	0,320	0,268	0,276	0,276	0,364	0,327	*0,345*

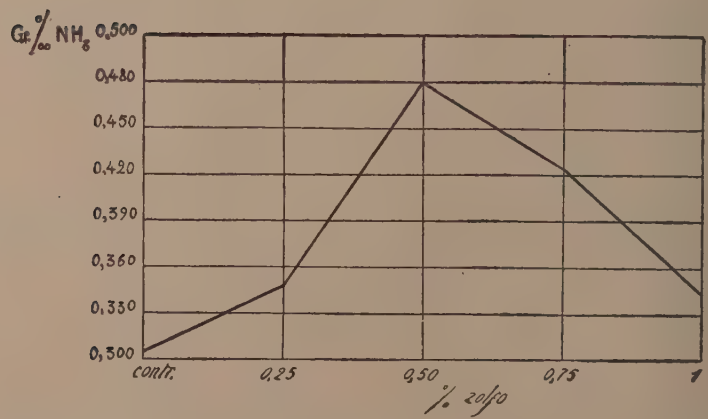

Fig. 1 – Diagramma della produzione di ammoniaca in presenza di zolfo.

TABELLA IV – B. – Nitrificazione

Colture	Grammi di HNO_3 per litro di liq. colturale						
	1	2	3	4	5	6	Media
Controllo	0,01	0,015	0,018	0,02	0,015	0,015	*0,0155*
Zolfo 0,25%	0,02	0,018	0,01	0,015	0,015	0,02	*0,0170*
„ 0,50%	0,0081	0,0074	0,0077	0,0072	0,0070	0,0082	*0,0076*
„ 0,75%	0,0084	0,0076	0,0075	0,0072	0,0081	0,0080	*0,0078*
„ 1%	0,0088	0,0078	0,0069	0,0077	0,0070	0,0068	*0,0075*

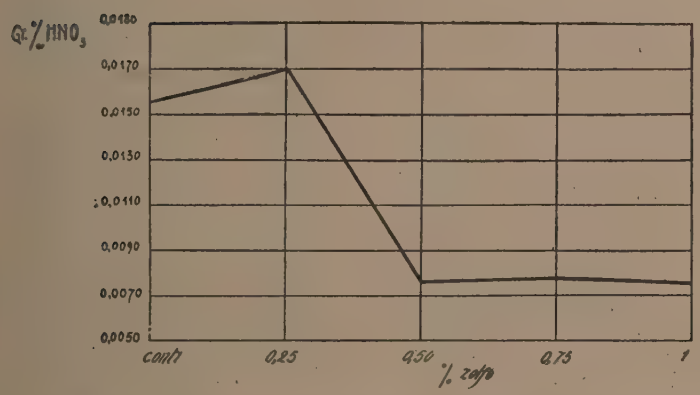

Fig. 2 – Diagramma della produzione di acido nitrico in presenza di zolfo.

TABELLA V - C. - Denitrificazione

Colture	Ore occorse per la scomparsa del nitrato								
	1	2	3	4	5	6	7	8	Media
Controllo	70	93	93	93	77	77	81	80	83
Zolfo 0,25%	70	75	75	76	77	77	82	77	75
„ 0,50%	70	70	70	70	70	70	70	70	70
„ 0,75%	70	—	70	70	77	70	70	77	73
„ 1%	95	70	75	66	70	77	70	70	75

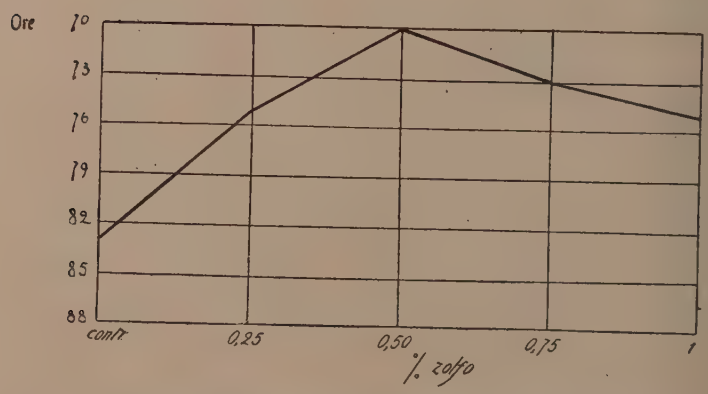

Fig. 3 - Diagramma della distruzione dei nitrati in presenza di zolfo

Tabella VI – D – Fissazione dell' azoto.

Ricerca N°	gr. di N per litro di liq. colturale	Controllo	Zolfo 0,25 %	Zolfo 0,50 %	Zolfo 0,75 %	Zolfo 1 %
1	iniziale	0,00714	0,00714	0,00714	0,00714	0,00714
	finale	0,08140	0,12540	0,10361	0,10003	0,08098
	guadagno	*0,07426*	*0,11826*	*0,09547*	*0,08098*	*0,07384*
2	iniziale	0,00714	0,00714	0,00714	0,00714	0,00714
	finale	0,08920	0,10904	0,10099	0,10547	0,08346
	guadagno	*0,08206*	*0,10190*	*0,09385*	*0,09743*	*0,07632*
3	iniziale	0,00531	0,00531	0,00531	0,00531	0,00531
	finale	0,06340	0,08976	0,09378	0,06932	0,06312
	guadagno	*0,05769*	*0,08445*	*0,08847*	*0,06401*	*0,05781*
4	iniziale	0,00531	0,00531	0,00531	0,00531	0,00531
	finale	0,06000	0,07592	0,09532	0,07831	0,07000
	guadagno	*0,05469*	*0,07061*	*0,09001*	*0,07300*	*0,06469*
	Media guadagni	0,06717	0,09380	0,09195	0,08183	0,06817

La putrefazione della sostanza organica appare nettamente favorita da mediocri quantità di zolfo – 0,5 e 0,75 % – mentre una quantità piuttosto elevata non ne deprime l' intensità rispetto al controllo.

Minime dosi di zolfo attivano leggermente o per lo meno non disturbano la nitrificazione; aumentando le proporzioni di zolfo, diminuisce sensibilmente la produzione di nitrato, senza peraltro essere inibita neanche da una quantità di zolfo piuttosto ragguardevole. A questo proposito è da tenere presente che il carbonato di magnesio presente nel mezzo di coltura contribuisce energicamente

a neutralizzare l' acidità prodottasi : in questo senso potrebbe spiegarsi la debole attivazione esplicata da piccole dosi di zolfo. L' ossidazione di questo provo-

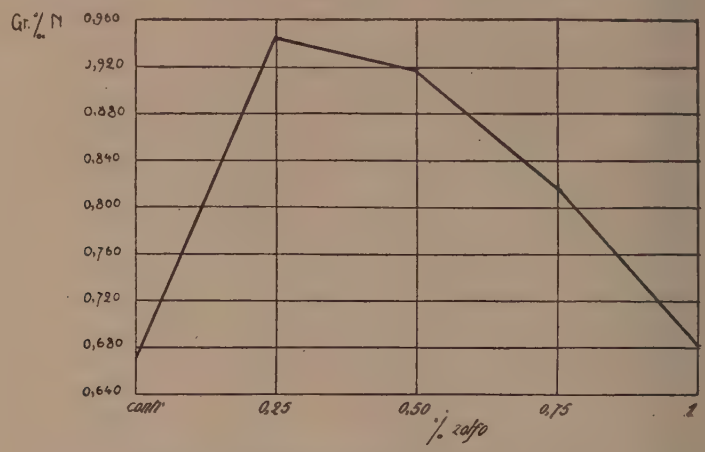

Fig. 4 – Diagramma della fissazione di azoto in presenza di zolfo

cherebbe la formazione di acido solforico, il quale attaccherebbe il carbonato di magnesio fissando la base e rendendo libera anidride carbonica che verrebbe così ad essere più agevolmente ed intensamente utilizzata dai batteri nitrificanti nel lavoro di sintesi, con conseguente incremento della loro attività specifica.

La depressione causata dall' aggiunta di zolfo non è affatto dipendente dalla sua quantità, essendo essa piuttosto forte per il 5% e mantendosi quindi presso a poco costante per le proporzioni maggiori.

Il fatto è probabilmente collegato a circostanze molto complesse e relative al modo con cui avviene l' attacco microrganico dello zolfo od anche all'assenza o quasi di sostanze-tampone nel mezzo. Senza voler sopravalutare una costatazione che esigerebbe più ampia discussione, basterà per ora osservare che se la composizione eminentemente minerale del liquido di coltura può giustificare largamente l' ipotesi di un intervento di microrganismi autotrofi nell'evoluzione dello zolfo, la costante scarsezza con cui questa sembra verificarsi per quan-

titativi crescenti dell' elemento, può far pensare che non sempre queste forme autotrofe attacchino direttamente lo zolfo, bensì qualche suo composto incompletamente ossidato od anche idrogenato che dovrebbe la propria origine ad altri microrganismi tributari della sostanza organica. Al riguardo giova considerare che di sostanza organica presente v' era soltanto la tenuissima quantità che poteva essere contenuta nel grammo di terra adoperato per l' inoculazione.

Resta anche a vedere quale sia il ruolo che potrebbero avere i batteri della nitrificazione nella trasformazione dello zolfo e quale sia l' influenza dei nitrati sull' attività delle forme che lo attaccano.

Sulla scorta delle conoscenze acquisite, risulta accertato il fatto che in un mezzo ricco di sostanza organica azotata la trasformazione dello zolfo verso una forma di combinazione più o meno stabile avviene rapidamente (GUITONNEAU) e con effetti evidentissimi, come appare dai reperti ottenuti in questo lavoro nelle prove di ammonizzazione ed in quelle relative allo sviluppo dell' anidride carbonica: sarà ad ogni modo interessante ricercare e precisare a quale genere di composti dello zolfo è da ascrivere questa esaltazione delle attività microbiche.

La denitrificazione denunzia una leggerissima accelerazione per l' aggiunta di zolfo, che, almeno nelle condizioni di esperienza, non agisce in diretta dipendenza del suo contenuto.

Infine, la fissazione dell'azoto elementare è incontestabilmente favorita, specie da quantità di zolfo comprese fra il 2,5 ed il 7,5 ‰.

III - *Solubilizzazione dell'anidride fosforica e della potassa.*

La soluzione nutritiva base fu la seguente:

glucosio	gr.	35
solfato di magnesio	»	0,1
solfato di manganese	»	0,1
cloruro di sodio	»	0,05
cloruro ferrico	»	0,05
acqua distillata	c.c.	1000

Divisa la soluzione in due parti uguali, alla prima di esse addizionai tartrato ammonico in ragione di gr. 2 ‰ nonchè cloruro potassico in ragione di gr. 0,1 ‰ (liquido colturale per la solubilizzazione dell' anidride fosforica), ed alla seconda fosfato ammonico nella proporzione di gr. 2 ‰ (liquido colturale per la solubilizzazione della potassa).

Preparate quattro Erlenmeyer da 1000 c.c., distribuii in due di esse ed in volumi uguali (400 c.c. per ciascuna beuta) la prima parte della soluzione: ugualmente distribuii la seconda parte nelle altre due Erlenmeyer.

Per l'esperienza relativa all' anidride fosforica, aggiunsi alla soluzione una quantità di fosfato tricalcico (titolo 45,74 %) corrispondente al 1 ‰ di anidride fosforica, cioè gr. 0,8744.

Per la potassa, impiegai leucite pulverulenta (titolo 15,69 %), sempre in dose tale da immettere nella soluzione 1 ‰ di ossido di potassio (gr. 2,5493). Il fosfato tricalcico e la leucite vennero aggiunti prima della sterilizzazione in autoclave, mentre lo zolfo fu addizionato dopo a due delle quattro Erlenmeyer – una per ciascun tipo dei suddetti liquidi colturali – e nella misura del 1 %.

Inoculati i liquidi con 1 c.c. di stemperamento 1 terra/1 acqua e determinato il contenuto iniziale in anidride fosforica e potassa solubili, collocai le colture in termostato a 28° C., dove rimasero per 30 giorni.

Ogni 5 giorni furono prelevati da ciascuna beuta 55 c.c. di liquido su cui, dopo filtrazione alla pompa e previa distruzione della sostanza organica con ripetuto trattamento di acido nitrico, vennero eseguite le determinazioni dell' anidride fosforica e della potassa solubili in acidi deboli, seguendo i comuni metodi di analisi.

Per quanto riguarda i caratteri macroscopici dello sviluppo, nella coltura attiva con fosfato tricalcico notai al 6° giorno un incipiente sviluppo ifomicetico, sviluppo che progredì fino al 20° giorno, formando una spessa coperta; nelle colture con leucite mancò sviluppo ifomicetico. In tutte le Erlenmeyer lo svi-

(*) – I titoli del fosfato tricalcico e della leucite furono rigorosamente controllati con l'analisi.

luppo segnò un intensissimo incremento dal 3° al 10° giorno e rimase poi apparentemente stazionario.

TABELLA VII – Anidride fosforica (P_2O_5) e potassa (K_2O) solubilizzatesi, in gr. per 100 di liquido colturale

	P_2O_5		K_2O	
	Controllo	Colt. attiva	Controllo	Colt. attiva
iniziale	0,0049	0,0049	tr.	tr.
al 5° giorno	0,0154	0,0197	0,0060	0,0078
al 10° »	0,0209	0,0348	0,0067	0,0126
al 15° »	0,0246	0,0346	0,0068	0,0097
al 20° »	0,0159	0,0262	0,0056	0,0098
al 25° »	0,0112	0,0244	0,0041	0,0066
al 30° »	0,0050	0,0180	0,0026	0,0059

Per effetto della filtrazione – d' altra parte indispensabile per non avere nel liquido da analizzare fosfato tricalcico, leucite, o zolfo inattaccati – il volume prelevato si riduceva di 3-4 ed anche 5 c.c.; quindi l' analisi venne eseguita sempre sul volume costante di 50 c.c..

I residui di filtrazione consistevano in fiocchi di consistenza mucillaggino-sa, che all' esame miscroscopico si presentavano costituiti da un infinito numero di zooglee microbiche, od in piccoli frammenti di membrane fungine.

L'osservazione dei reperti analitici pone in evidenza, sia per l'anidride fosforica che per la potassa, un sensibilissimo aumento di solubilizzazione nei liquidi contenenti zolfo. Tanto in un caso quanto nell'altro, la punta si verificò al 10° giorno e le percentuali diminuirono progressivamente fino al trentesimo.

La spiegazione di questo deve essere ricercata nel fatto che al 13° giorno

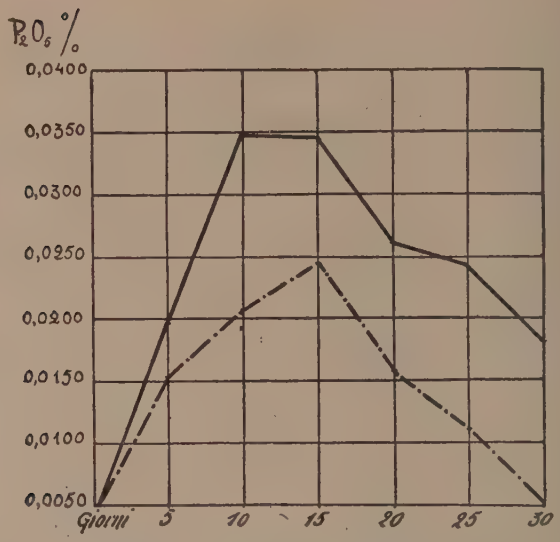

Fig. 5 – Diagramma della solubilizzazione dell'anidride fosforica in presenza di zolfo (la linea tratteggiata è il controllo)

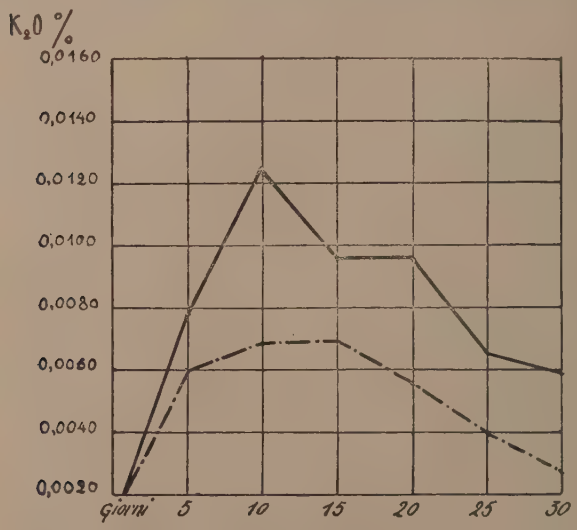

Fig. 6 – Diagramma della solubilizzazione della potassa in presenza di zolfo (la linea tratteggiata è il controllo).

il liquido colturale aveva quasi del tutto esaurito il proprio contenuto in glucosio (saggio con il reattivo di FEHLING); venendo così a difettare la sorgente energetica di pronta utilizzazione (*), lo sviluppo microrganico dovette necessariamente subire un notevolissimo progressivo rallentamento. È certo che al periodo di rigoglio microbico corrispose la massima intensità nel processo di trasformazione dello zolfo e che i prodotti di natura acida da questa originatisi costituirono gli agenti più energici della solubilizzazione.

Indubbiamente una parte dell'anidride fosforica e della potassa rese solubili debbono essere state assorbite ed organicate nel metabolismo microbico, e mentre questo fenomeno è rimasto mascherato durante i primi 10 o 15 giorni per l'intensità verificatasi nella dissoluzione, esso è apparso evidentissimo nel periodo successivo, in cui l'attacco del fosfato tricalcico e della leucite deve essere stato ridotto ai minimi termini per la diminuita o cessata attività microrganica anche nei riguardi dello zolfo. È da pensare anzi che anidride fosforica e potassa presenti ancora in soluzione siano andate a far parte di forme di combinazione più o meno complesse di natura prevalentemente organica, che rimanevano sottratte all'analisi per la filtrazione subita dai liquidi prelevati. A questo proposito giova ricordare che il residuo di filtrazione era assai più considerevole nell'ultimo prelevamento che non in quelli precedenti.

Rimane da stabilire se nel terreno queste combinazioni organiche di cui è stato fatto cenno altra volta ([80]), possano avere un valore nutritivo per i vegetali, sia pure come alimento di lenta e indiretta assimilabilità. In via di ipotesi, non è azzardato supporre che, attraverso il complesso lavorio di demolizione operato dalla microflora, potassa e anidride fosforica possano ritornare in circolo sotto forme minerali più o meno solubili. Quanto si è verificato nelle col-

(*) – L'acido tartarico, presente del resto in tenue quantità in uno dei due liquidi colturali, non può considerarsi una sorgente di carbonio rapidamente assimilabile dai microrganismi in genere. La sostanza ternaria presente nel materiale d'inoculazione, per la sua scarsità, non può avere avuto che un ruolo molto secondario.

ture della presente esperienza può anche essere attribuito alla scarsissima o addirittura mancante idrolisi della sostanza proteica formatasi nel primo periodo di alta vitalità microbica, per la carenza del mezzo in materiale carboidrato.

IV – *Influenza dello zolfo su la produzione di anidride carbonica.*

Allestii 8 Erlenmeyer da 500 c. c. con 200 c. c. ciascuna di soluzione nutritiva: glucosio gr. 10, peptone (Witte) gr. 1, acqua distillata c. c. 100. A quattro aggiunsi zolfo nelle medesime proporzioni impiegate nelle esperienze relative alle attività microbiochimiche specifiche. Tutte furono inoculate con gr. 1 di terra.

Ogni Erlenmeyer così preparata fu chiusa con tappo di gomma a due tubi di vetro – muniti di robinetto – di cui uno più lungo pescante nel liquido e l'altro più corto con estremità poco sporgente dal tappo nell'interno del recipiente. All'inizio dell'esperienza, il primo di questi tubi venne collegato ad una bottiglia di lavaggio contenente una soluzione di KOH al 10% ed il secondo ad una pompa aspirante, allo scopo di sostituire all'aria contenuta nei recipienti, dell'aria completamente decarbonicata. Dopo aver sottoposto per un'ora ciascuna Erlenmeyer all'azione della pompa, chiusi il rubinetto corrispondente alla bottiglia di lavaggio ed innestai al tubo più corto tre bolle di Liebig, collegate in serie, di cui la prima con acido solforico conc., la seconda con idrato potassico al 10% e la terza con acido solforico conc.: la seconda e la terza bolla furono previamente tarate.

Collocato il tutto in termostato a 25° C., al termine del settimo giorno ristabilii la comunicazione con la bottiglia di lavaggio e congiunsi le bolle di Liebig alla pompa che, funzionando per un'ora, spostò l'anidride carbonica rimasta imprigionata in seno al liquido della beuta nella bolla con potassa: quindi pesai nuovamente le due bolle surricordate. La differenza fra la seconda e la prima pesata di ciascun, coppia di bolle, indicò la quantità di anidride carbonica formatasi nei liquidi colturali per effetto delle complesse fermentazioni in essi verificatesi. I risultati sono appresso indicati.

TABELLA VIII

Colture		gr. di CO_2 nel liquido colturale	
		Controllo	colt. attive
zolfo	0.25 %	0.4553	0.5294
„	0.50 %	0.5302	0.5922
„	0.75 %	0.5934	0.6200
„	1 %	0.5231	0.5634

Lo zolfo accelera sensibilmente la decomposizione delle sostanze proteiche e di quelle carboidrate. Quest' esperienza, da considerarsi come una riprova di quella relativa all' ammonizzazione, conferma ancora una volta le favorevoli influenze che zolfo e sostanza organica azotata esercitano vicendevolmente sui processi di evoluzione microbica.

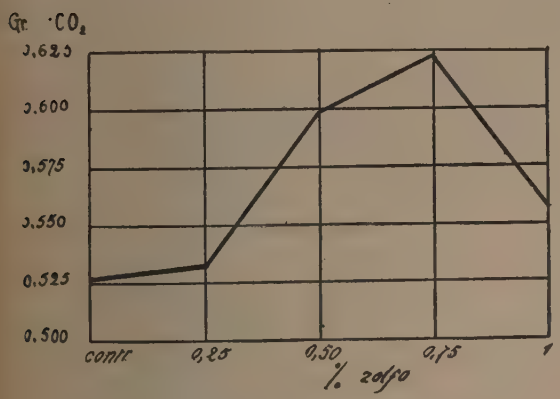

Fig. 7 – Diagramma della produzione di anidride carbonica in presenza di zolfo.

V. – *Esperienze di adsorbimento.*

A – CAPACITÀ ADSORBENTE PER L' ACQUA

Tubi di vetro del diametro costante di cm. 5 e di lunghezza variabile da 5 a 50 cm. furono riempiti di terra soltanto o di terra intimamente mescolata

con diverse quantità di zolfo, trattenuta da un diaframma di tela a larga trama fissato ad una estremità dei tubi stessi. Disposti questi verticalmente a mezzo di appositi telai, vennero collocati, in corrispondenza dell'estremità inferiore di ogni tubo chiusa dalla tela, altrettanti imbuti introdotti in Erlenmeyer da 500 c. c.

Una quantità di acqua, sempre uguale per tutti i tubi della stessa lunghezza, fu versata a più riprese in essi, e quella raccolta nelle Erlenmeyer venne misurata allorchè era finito il percolamento.

Tabella IX.

Gruppo:	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
tubi cm.:	5	10	20	25	30	35	40	50
terra gr.:	100	210	400	450	500	575	700	1200
acqua cc.:	200	250	300	350	350	400	400	400
				acqua percolata cc.				
controllo	156,60	182,20	266,90	222,50	206,60	228,—	235,70	150,10
controllo	154,60	179,90	267,40	221,70	208,40	230,—	—	—
1 gr. di zolfo	154,40	175,60	258,35	222,20	209,20	221,—	233,80	—
2 gr. „	156,90	176,80	256,—	217,70	214,90	220,50	—	137,60
3 gr. „	153,80	175,—	256,90	220,80	208,70	228,50	241,50	—
4 gr. „	151.90	174,90	262,30	223,—	217,10	235,—	—	149.30
5 gr. „	153,—	177,50	266,60	222,50	217,—	222,80	243,50	—
6 gr. „	151,75	176,30	259,90	210,30	216,—	223,90	—	136,50
7 gr. „	152,80	178,—	259,30	212,10	206,20	223,—	245,—	—
8 gr. „	149,—	176,—	260,30	215,10	210,80	218,30	—	140.70
				umidità residuata %				
controllo	24.82	26,15	27,90	26,96	27,95	28,95	29,—	29,40
controllo	24,—	25,95	28,30	26,30	28,35	—	—	—
1 gr. di zolfo	23:70	25,96	28,15	26,26	27,23	28,65	28,41	—
2 gr. „	23,80	25,40	27,24	26,38	28,04	29,—	—	29,30
3 gr. „	23,60	25,30	27,50	27,90	27,80	28,80	27,90	—
4 gr. „	22,40	26,20	26,93	24,91	28,32	28,90	—	29,—
5 gr. „	22,10	25,—	26,16	25,30	27,35	28,20	27,—	—
6 gr. „	22,80	25,40	27,19	26,60	25,85	28,10	—	28,70
7 gr. „	21,80	25,60	26,92	25,60	27,—	28,30	27,30	—
8 gr. „	22,20	23,—	26,03	24,70	24,—	28,20	—	28,—

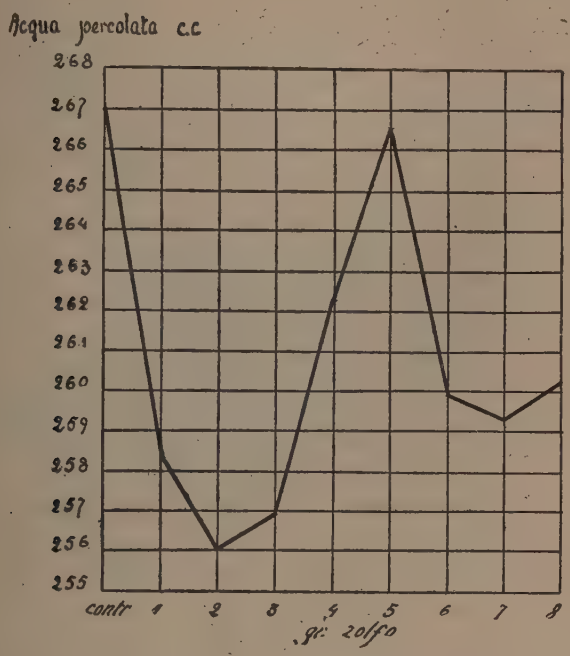

Fig. 8 – Diagramma dell'adsorbimento dell'acqua in terreno contenente zolfo (tubi da cm. 20; terra gr. 400).

Vi è da osservare che lo zolfo, per quanto accuratamente rimescolato con la terra al momento di riempire i tubi, allorchè era aggiunta l'acqua veniva in parte a galleggiare, formando una pellicola superficiale e conseguentemente – via via che l'acqua era assorbita – un deposito sulle pareti dei tubi, tanto maggiore quanto più elevata era la quantità di zolfo.

I tubi furono lasciati a sè per 7 giorni, dopo i quali fu in essi determinata l'umidità residua, essiccando la terra a 100° C..

Non furono notate sensibili differenze di tempo nell'inizio e nell'arresto del percolamento fra i diversi tubi di una stessa serie, lo scarto maggiore essendosi

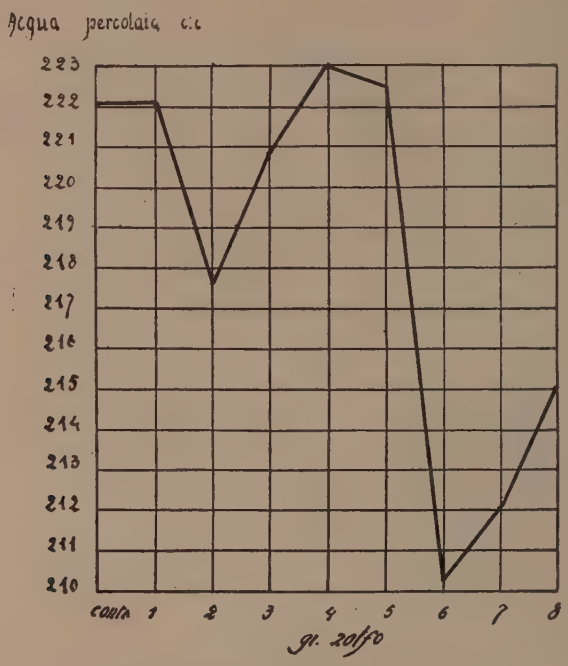

Fig. 9 – Diagramma dell'adsorbimento dell'acqua in terreno contenente zolfo (tubi da cm. 25; terra gr. 450).

aggirato intorno ai 4-5 minuti, senza che l'anticipo od il ritardo interessasse costantemente i controlli od i tubi con zolfo e fra questi quelli a più piccola od a più alta proporzione.

Dai risultati sopra riportati, per quanto concerne l'adsorbimento dell'acqua può esser concluso che, allorquando si aggiunge zolfo al terreno, esso contribuisce quasi sempre a ritenervi una maggiore quantità di umidità, e che l'effetto massimo si raggiunge per uno spessore di terra aggirantesi sui 25 cm. e per una quantità di zolfo di circa 13/17‰, senza che peraltro questo fatto sia proporzionato al quantitativo di zolfo; forse perchè non si può raggiungere un rimesclamento del tutto uniforme della sostanza con le particelle terrose.

Diversamente vanno le cose esaminando, dopo una settimana, l' umidità trattenuta dalla terra soltanto nei confronti di quella mescolata con zolfo, poichè, generalmente, essa si dimostra meglio trattenuta dalla prima piuttosto che dalla seconda.

B – Capacità adsorbente per i sali ammoniacali ed i nitrati

La serie dei tubi di 20 cm. fu riempita con le stesse quantità di terra e zolfo della prova precedente; invece dell' acqua fu versata nei tubi una uguale quantità di soluzione (300 c. c.) di solfato ammonico all' 1 ‰.

Dopo il percolamento, i liquidi raccolti nelle Erlenmeyer vennero distillati su magnesia usta per determinarvi l' ammoniaca.

Tabella X.

Tubi	Liquido percolato cc.	NH_3 nel liquido percolato gr.	NH_3 in 100 di liquido gr.
Controllo	263,50	0,03243	0,01231
Controllo	263,90	0,03272	0,01240
1 gr. zolfo	261,50	0,03243	0,01240
2 » »	261,40	0,03000	0,01150
3 » »	260,40	0,02994	0,01150
4 » »	260,80	0,03233	0,01240
5 » »	260,40	0,03205	0,01231
6 » »	260,90	0,03000	0,01150
7 » »	261,—	0,03001	0,01150
8 » »	261,—	0,03100	0,01187

Con i medesimi tubi e seguendo lo stesso procedimento, fu procurato di determinare l'adsorbimento di una soluzione all'1 ‰ di nitrato di sodio. Sui liquidi percolati venne determinata la concentrazione di azoto nitrico ed essa risultò in tutti i casi uguale a quella della soluzione primitiva.

L'adsorbimento della terra per i sali ammoniacali ed i nitrati non appare favorito dal trattamento con zolfo.

Tutte queste prove su la capacità adsorbente del terreno nei riguardi dello zolfo non possono avere che un valore del tutto relativo al tipo di terreno adoperato (vedi analisi al cap. seguente), ed occorrerebbe di estenderle a terreni di diversa natura fisico-chimica per avere indicazioni veramente attendibili, donde poter trarre insegnamenti d'indole pratica. Particolarmente istruttivo potrà riuscire lo studio del comportamento dello zolfo verso i colloidi del terreno.

VI. *Prove di vegetazione in vaso.*

Diciotto vasi di 30 cm. di diametro vennero distinti in tre serie di sei vasi ciascuna, delle quali la prima fu riempita con terra dell'orto sperimentale, (1) la seconda con sabbia d'Arno (2) e la terza con un miscuglio in parti uguali di terra e di sabbia.

Il 6 marzo 1932 procedetti alla semina del frumento, mettendo venti semi per ogni vaso; il frumento era di varietà "Mentana".

I vasi furono tenuti costantemente all'aperto, sotto una tettoia, e adacquati periodicamente con uguali quantità di acqua.

---

(1) Analisi della terra dell'orto sperimentale (Luchetti): Acqua igroscopica 3,87 %, Argilla 26,86 %, Sabbia 51,16 %, Sost. organica 5,71 %, Calcare 12,40 %, N totale 0,16 %, P_2O_5 totale 0,20 %, K_2O totale 0,13 %.

(2) Analisi della sabbia d'Arno (Luchetti): Calcare 15,90 %, P_2O_5 tracce.

Avvenuta la fuoriuscita delle piantine, ne vennero lasciate cinque per ogni vaso, estirpando tutte le altre.

Una prima differenza di sviluppo a favore dello zolfo, verso la fine di aprile, fu notata per la serie sabbia; in seguito anche nei vasi con terra il grano denunziò maggiore rigoglio rispetto ai controlli.

Fra le colture in sabbia e quelle in terra, al 10 giugno, apparentemente, dato il maggiore accrescimento dei culmi, le prime presentavano in complesso un' apprezzabile vantaggio sulle seconde.

Queste differenze – per quanto attenuate poi nella sabbia – si mantennero fino alla maturazione che avvenne presso a poco contemporaneamente in tutti i vasi, controlli compresi.

In seno a ciascuna serie, al momento del raccolto che venne effettuato il 7 luglio, potei fare alcune osservazioni. Nelle colture in sabbia la massima altezza dei culmi ed il migliore accestimento si notarono per il vaso con la quantità di zolfo corrispondente a 5 Q.li per Ha, mentre il vaso con la quantità di zolfo corrispondente a Q.li 2,5, pure essendo migliore dei controlli, presentava una visibile inferiorità rispetto a quelli con le massime quantità di zolfo. Nelle colture in terra il migliore sviluppo era evidentemente quello del vaso con dose equivalente a Q.li 2,5 di zolfo. gli altri presentando uno sviluppo degradante presso a poco con l' aumentare del quantitativo. In ambedue le serie, i vasi con zolfo, anche quelli meno rigogliosi, non apparivano mai inferiori ai rispettivi controlli.

Nella serie terra + sabbia non si presentavano sensibili diversità di sviluppo fra controlli e vasi con zolfo.

I risultati ottenuti dalte pesate dei culmi di grano sono riportati nella Tabella seguente.

Anche trascurando la serie terra + sabbia - che tuttavia ha anch' essa dato in tutti i casi prodotti superiori ai controlli – e prendendo in considerazione le altre due, è chiarissimo il vantaggio verificatosi per la somministrazione di zolfo in medie quantità.

È ovvio che l' ottimo si sia ottenuto nella terra, ivi il grano avendo tro-

Tabella XI

Colture	Sabbia			Terra			Terra + Sabbia		
	N. culmi	Peso complessivo	Peso medio culmo con spiga	N. culmi	Peso complessivo	Peso medio culmo con spiga	N. culmi	Peso complessivo	Peso medio culmo con spiga
1 Controllo	9	10,35	1,15	10	11,12	1,11	10	11,30	1,13
2 „	10	11,—	1,10	10	11,30	1,13	7	7,63	1,09
3 zolfo Q.li 2,5 (1)	10	12,60	1,26	14	23,05	1,64	10	12,—	1,20
4 „ „ 5	13	17,94	1,38	11	15,50	1,40	13	14,43	1,11
5 „ „ 7,5	12	14,40	1,20	8	10,—	1,25	9	11,25	1,28
6 „ „ 10	10	11,—	1,10	10	11,50	1,15	11	13,53	2,23

(1) Quantitativo per Ha.

vato un maggiore nutrimento e lo zolfo un mezzo più adatto alla sua ossidazione. Il buon esito avuto nella sabbia è, forse, in massima parte dipendente dal tangibile arricchimento del substrato, e quindi dell' aria immediatamente ad esso sovrastante, in anidride carbonica per effetto della reazione fra il calcare contenutovi e l' acido solforico.

Il 20 aprile 1932 furono prelevati da tutti i vasi di vegetazione altrettanti campioni alle profondità di 5 e 10 cm. e su di essi fu eseguito l' esame quantitativo e qualitativo della microflora. Un campione medio delle due profondità per i vasi 1, 2, 3 della serie terra e 1, 2, 4 della serie sabbia - dei vasi con zolfo furono prescelti il 3 per la terra ed il 4 per la sabbia, presentando già un migliore sviluppo degli altri - servì per la misura delle attività microbiochimiche.

Il materiale fu prelevato in un momento in cui l' attività microrganica,

A – *Esame quantitativo e qualitativo della microflora* (*).

1ª serie – sabbia.

a) profondità 5 cm. (**).

TABELLA XII

Colture	Schizomiceti + Actinomiceti		Actinomiceti	Ifomiceti
Controllo	150.000 187.500	168.500	—	—
Controllo	150.000 130.000	140.000	—	—
Zolfo Q.li 2,5	113.000 187.000	150.000	—	—
„ „ 5	133.450 148.300	140.875	—	—
„ „ 7,5	125.000 80.000	102.500	—	—
„ „ 10	35.000 30.000	32.500	—	—
b) profondità 10 cm.				
Controllo	1.326.000 1.044.000	1.185.000	5.000	30.000
Controllo	1.200.000 1.100.000	1.150.000	10.000	43.200
Zolfo Q.li 2,5	965.800 983.400	974.600	2.300	64.000
„ „ 5	874.000 976.340	925.170	2.700	96.800
„ „ 7,5	750.000 620.000	685.000	1.000	80.000
„ „ 10	380.000 570.000	475.000	—	16.000

(*) Il numero delle microforme è riferito ad 1 gr. di terra. Le conte furono eseguite su colture a piatto all' agar-fagiuoli.

(**) Per i campioni di questa profondità non fu potuto eseguire l' esame qualitativo.

2ª serie – terra.

a) profondità 5 cm.

TABELLA XIII.

Colture	Schizomiceti + Actinomiceti		Actinomiceti	Ifomiceti
Controllo	1.190.000 1.200.000	1.195.000	85.000	5.000
Controllo	970.000 920.000	945.000	90.000	10.000
Zolfo Q.li 2,5	950.000 990.000	970.000	90.000	5.000
„ „ 5	1.100.000 780.000	940.000	80.000	10.000
„ „ 7,5	1.000.000 990.000	995.000	5.000	5.000
„ „ 10	800.000 990.000	895.000	—	5.000
b) profondità 10 cm.				
Controllo	2.100.000 1.170.000	1.920.000	50.000	55.000
Controllo	1.940.000 1.750.000	1.845.000	35.000	60.000
Zolfo Q.li 2,5	1.995.000 1.875.000	1.935.000	50.000	76.000
„ „ 5	1.650.000 1.650.000	1.650.000	30.000	120.000
„ „ 7,5	1.560.000 1.700.000	1.630.000	20.000	100.000
„ „ 10	1.464.000 1.630.000	1.547.000	2.000	40.000

(*) Le cifre relative agli Actinomiceti risultano dalla media delle due conte per ciascun campione.

3ª serie – terra + sabbia.

a) profondità 5 cm.

TABELLA XIV.

Colture	Schizomiceti + Actinomiceti		Actinomiceti	Ifomiceti
Controllo	1.000.000 1.050.000	1.025.000	20.000	18.000
Controllo	990.000 980.000	985.000	40.000	32.000
Zolfo Q.li 2,5	550.000 400.000	475.000	20.000	15.000
„ „ 5	900.000 850.000	875.000	17.000	28.000
„ „ 7,5	990.000 950.000	970.000	20.000	45.000
„ „ 10	400.000 450.000	425.000	5.000	10.000

b) profondità 10 cm.

Controllo	1.800.000 1.000.000	1.400.000	45.000	27.000
Controllo	950.000 1.200.000	1.075.000	20.000	17.000
Zolfo Q.li 2,5	1.500.000 1.200.000	1.350.000	30.000	20.000
„ „ 5	850.000 590.000	720.000	10.000	20.000
„ „ 7,5	1.000.000 1.050.000	1.025.000	2.500	30.000
„ „ 10	1.030.000 930.000	980.000	—	10.000

avrebbe dovuto essere massima anche nei riguardi delle trasformazioni dello zolfo.

L' esame quantitativo in tutti i vasi di vegetazione pone in chiara evidenza quanto sopra ho detto, poichè la più o meno forte depressione in quelli con zolfo rispetto ai controlli – la costanza del fenomeno in tutti i casi ne costituisce la testimonianza più eloquente – non può essere attribuita che alla presenza di variabili proporzioni di acido solforico o di qualche altro composto che operino una parziale sterilizzazione, almeno fino a quando la loro attività non venga annullata dal terreno. Le reazioni di scambio fra acido e basi avverranno certo senza soluzioni di continuità, ma non può escludersi che in una fase di intensa ossidazione dello zolfo la velocità di questo fenomeno superi quella della neutralizzazione.

Non sempre l' azione dello zolfo appare relativa alla quantità, come in quasi tutti i vasi con terra e terra + sabbia. A questo riguardo bisogna però riportarsi all' azione tamponante esercitata dalla sostanza organica e dai colloidi presenti. Infatti, una costante dipendenza della depressione microbica dalla quan-

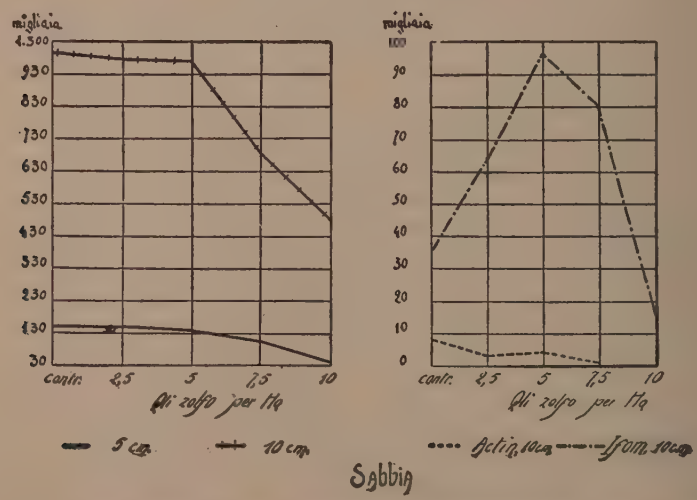

Fig. 10. – Diagramma della popolazione microbica in substrato colturale di sabbia

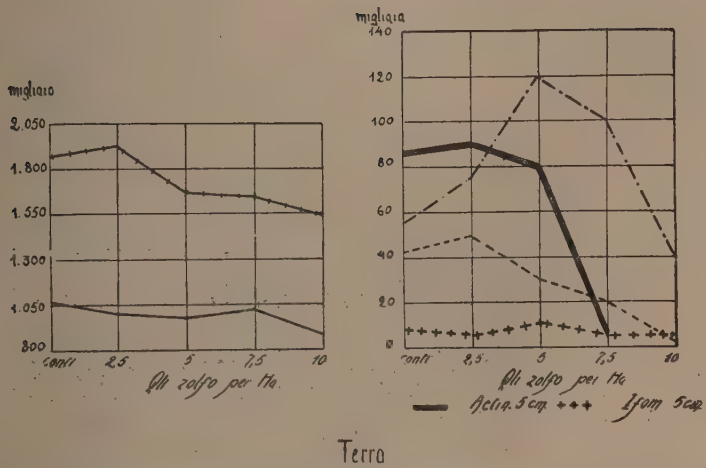

Fig. 11. – Diagramma della popolazione microbica in substrato colturale di terra medio impasto

tità di zolfo si riscontra nella sabbia d' Arno, dove le due suddette categorie di sostanze si trovano in dosi più che ridotte.

La minore entità della microflora alla profondità di 5 cm. è del tutto collegata alla più sensibile produzione di acido solforico che si avrà in uno strato vicinissimo alla superficie e quindi maggiormente aereato.

Per quanto riguarda la qualità della microflora, gli Actinomiceti, salvo alcuni scostamenti, seguono ovonque l' andamento degli Schizomiceti, mentre gli Ifomiceti, particolarmentc nei vasi con terra ed in quelli con sabbia, denunziano delle punte superiori, anche notevolmente, ai controlli laddove trovasi lo zolfo: però un' aggiunta di questo in misura di 10 Q.li per Ha causa sempre una loro sensibile diminuzione rispetto alle aggiunte inferiori.

B – *Attività microbiochimiche.*

I – Ammonizzazione

TABELLA XV

Colture	Grammi di NH_3 per litro di liq. colturale				
	1	2	3	4	Media
a – *sabbia*					
Controllo (c. m.)	0,259	0,223	0,258	0,296	*0,259*
zolfo Q.li 5	0,350	0,341	0,328	0,317	*0,334*
b – *terra*					
Controllo (c. m.)	0,730	0,700	0,707	0,727	*0,716*
zolfo Q.li 2,5	0,785	0,841	0,806	0,812	*0,811*

II – Nitrificazione

TABELLA XVI

Colture	Grammi di HNO_3 per litro di liq. colturale			
	1	2	3	Media
a – *sabbia*				
Controllo (c. m.)	0,0045	0,0060	0,0060	*0,0055*
zolfo Q.li 5	0,0030	0,0040	0,0015	*0,0030*
b – *terra*				
Controllo (c. m.)	0,014	0,015	0,010	*0,0130*
zolfo Q.li 2,5	0,006	0,008	0,007	*0,007*

III – Denitrificazione

TABELLA XVII

Colture	Ore occorse per la scomparsa del nitrato				
	1	2	3	4	Media
a – *sabbia*					
Controllo (c. m.)	57	57	57	57	*57*
zolfo Ql. 5	54	55	58	57	*56*
b – *terra*					
Controllo (c. m.)	56	52	58	54	*55*
zolfo Ql. 2,5	56	50	54	52	*53*

IV – Fissazione dell'azoto

TABELLA XVIII

Colture	Grammi di N per litro di liquido colturale						Media guadagni
	1			2			
	iniziale	finale	guadagno	iniziale	finale	guadagno	
a – *sabbia*							
Controllo (c. m.)	0,00102	0,02316	0,02214	0,00102	0,01716	0,01614	*0,01914*
zolfo Ql. 5	0,00203	0,03803	0,03600	0,00203	0,03301	0,02098	*0,02849*
b – *terra*							
Controllo (c. m.)	0,00427	0,02931	0,02504	0,00427	0,03083	0,02656	*0,02580*
zolfo Ql. 2,5	0,00500	0,04585	0,04085	0,00500	0,04985	0,04495	*0,04285*

Questi risultati, in linea di massima, concordano con quelli ottenuti nelle prove riportate al Cap. II.

Un altro argomento che attende ulteriore delucidazione è quello dell' ossidazione dello zolfo in un mezzo piuttosto povero quale è quello costituito dalla sabbia dell' Arno, particolarmente per quanto riguarda il valore da attribuirsi alla trasformazione per via chimica nei confronti di quella microrganica.

A questo scopo, sono in corso delle prove di vegetazione in sabbia di quarzo (in ambiente sterile), addizionata in qualche caso di una conveniente proporzione di carbonato di calcio. Un controllo periodico dei solfati e degli iposolfiti eventualmente formantisi nel mezzo potrà dare un'idea sufficientemente precisa del grado di evoluzione dello zolfo.

VII. – *Prove di vegetazione in campo.*

Dodici parcelle di m. 1 per m. 2 furono seminate con frumento di varietà " Frassineto ", gentilmente fornito dall' Istituto di Cerealicoltura. Due parcelle furono lasciate per controllo ed alle altre fu somministrato zolfo nelle misure (per Ha) indicate nello schema.

Controllo	zolfo Q.li 3,5	zolfo Q.li 4	zolfo Q.li 5	zolfo Q.li 6	Controllo
zolfo Q.li 3	zolfo Q.li 2,5	zolfo Q.li 2	zolfo Q.li 1	zolfo Q.li 0,5	zolfo Q.li 1,5

La semina fu eseguita il 7 Novembre 1932.

La vegetazione mostrò un andamento uniforme in tutte le parcelle dal dicembre a tutto febbraio; da questa epoca a maggio, il grano di quelle con 2, 2,5 e 3 Q.li di zolfo si mantenne più alto dei rimanenti, compresi i controlli.

In seguito, le differenze si fecero meno evidenti, ma non scomparvero mai; il colore dei culmi e delle foglie si presentava molto più cupo nelle parcelle con zolfo, fra le quali, all' epoca della maturazione quella con 2 Q.li aveva gli steli più grossi e robusti.

Tre settimane prima della mietitura un violento temporale allettò una parte considerevole del frumento; maggiore resistenza fu constatata appunto nel

frumento della parcella 3, che si mantenne tutto eretto. L'allettamento più forte interessò i controlli e le parcelle con 1 Q.le e 6 Q.li di zolfo.

La mietitura avvenne il 6 luglio 1933: dopo essicazione, furono pesati i covoni di ògni parcella, ed eseguita la trebbiatura, le relative granella.

Tabella XIX

Parcelle	Peso dei culmi con spiga	Peso della granella
	Kg.	Kg.
Controllo	11,800	1,840
Controllo	11,400	1,460
zolfo Q.li 0,5	12,200	2,160
„ „ 1	12,—	2,220
„ „ 1,5	13,—	2,020
„ „ 2	14,200	2,500
„ „ 2,5	9,600	2,120
„ „ 3	13,400	2,280
„ „ 3,5	12,200	2,200
„ „ 4	8,200	1,970
„ „ 5	6,—	1,600
„ „ 6	10,800	1,120

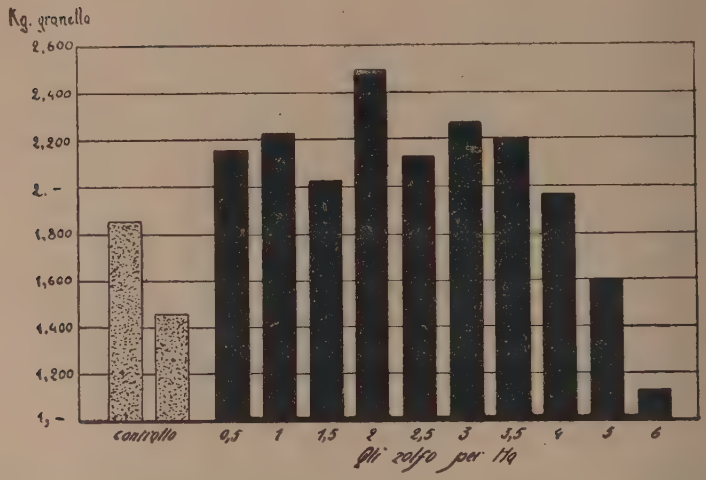

Fig. 12 – Grafico della produzione frumentaria in terreno trattato con zolfo

Il trattamento del terreno con zolfo in misura di 2 Q.li per Ha. ha dato un esito nettamente vantaggioso; del resto la produzione è risultata sempre superiore ai testimoni, non solo per quantitativi inferiori ma anche per quelli superiori al suddetto e fino a circa 5 Q.li di zolfo per ettaro.

Il 30 giugno furono prelevati, alla profondità di cm. 15, campioni di terreno dalle parcelle controllo e da quelle, rispettivamente, con Q.li 1,5, 3 e 6 di zolfo, procedendo alle determinazioni sotto riportate.

Non si palesano differenze sensibili fra le parcelle controllo e quelle con Q.li 1,5 e 3 di zolfo per Ha., mentre quella con 6 Q.li ha un comportamento nettamente sfavorevole in confronto alle altre, eccezione fatta per quanto riguarda la fissazione dell' azoto.

I presenti risultati si potrebbero spiegare con il fatto che, data la stagione avanzata in cui furono eseguiti gli esami, nelle parcelle con piccola e media quantità di zolfo questo doveva essere ormai già stato quasi tutto trasformato in solfati, mentre nella parcella con 6 Q.li questa trasformazione doveva trovarsi ancora in corso.

TABELLA XX – A - Ammonizzazione

Parcelle	Grammi di NH_3 per litro di liq. colturale				
	1	2	3	4	Media
Controllo	0,610	0,727	0,516	0,598	*0,617*
„	0,602	0,731	0.585	0,729	*0,661*
zolfo Ql. 1,5	0,725	0,680	0,600	0,619	*0,656*
„ „ 3	0,709	0,761	0,650	0,612	*0,683*
„ „ 6	0,436	0,508	0,411	0,400	*0,438*

TABELLA XXI – B. - Nitrificazione

Parcella	Grammi di HNO_3 per litro di liq. colturale				
	1	2	3	4	Media
Controllo	0,025	0,020	0,015	0,020	*0,020*
„	0,030	0,025	0,010	0,020	*0,021*
zolfo Ql. 1,5	0,025	0,010	0,020	0,025	*0,020*
„ „ 3	0,020	0,030	0,015	0,025	*0,025*
„ „ 6	0,0075	0,005	0,100	0,001	*0,008*

TABELLA XXII – C - Denitrificazione

Parcella	Ore occorse per la scomparsa del nitrato				
	1	2	3	4	Media
Controllo	62	62	63	62	62
Controllo	62	64	62	65	63
zolfo Ql. 1,5	60	63	62	62	62
„ „ 3	64	58	63	63	62
„ „ 6	60	62	61	60	61

TABELLA XXIII – D - Fissazione dell' azoto

Parcelle	Grammi di N per litro di liquido colturale						Media guadagni
	1			2			
	iniziale	finale	guadagno	iniziale	finale	guadagno	
Controllo	0,00303	0,07613	0,07310	0,00303	0,07044	0,06741	0,07525
Controllo	0,00510	0,08510	0,08000	0,00510	0,08916	0,08406	0,08203
zolfo Ql. 1,5	0,00089	0,08101	0,08012	0.00089	0,08220	0,08131	0,08071
„ „ 3	0,00371	0,07620	0,07249	0,00371	0,08359	0,07988	0,07618
„ „ 6	0,00109	0,08056	0,07947	0,00109	0,07860	0,07751	0,07849

TABELLA XXIV - E - Conta dei germi

Parcelle	Numero dei germi per 1 gr. terra
Controllo	1.925.000
Controllo	1.810.000
zolfo Ql. 1,5	1.900.000
„ „ 3	1.931.000
„ „ 6	1.000.000

Resta ad ogni modo sperimentalmente confermato che il trattamento del terreno con zolfo può dare sensibili aumenti di produzione nei riguardi del frumento.

La prova su altre colture, anche in terreni di diversa composizione, e ulteriori indagini sul meccanismo di evoluzione dello zolfo, saranno oggetto di prossime ricerche.

CONCLUSIONI

1 - Lo zolfo deprime, in generale, più o meno fortemente l'entità numerica della microflora e limita lo sviluppo ponderale degli Ifomiceti, in relazione al suo quantitativo.

2 - Delle attività microbiochimiche, l'ammonizzazione e la fissazione dell'azoto appaiono nettamente favorite dall'aggiunta di zolfo, mentre la denitrificazione subisce un'accelerazione appena sensibile: la nitrificazione appare leggermente favorita o quanto meno non disturbata da una dose di zolfo di circa il 2,5‰ e abbastanza depressa da proporzioni maggiori.

3 – La solubilizzazione dell' anidride fosforica e della potassa dai loro composti insolubili è attivata dalla presenza dello zolfo nei liquidi di coltura.

4 – Lo zolfo esalta la produzione di anidride carbonica in mezzi nutritivi ricchi di sostanze organiche azotate e idrocarbonate.

5 – Dai risultati ottenuti nelle prove di ammonizzazione ed in quelle di cui al paragr. 4. risultano confermati i reciproci vantaggiosi rapporti esistenti fra ossidazione microbiochimica dello zolfo e decomposizione della sostanza organica.

6 – Lo zolfo mescolato alla terra tende, generalmente, ad aumentare in questa la capacità adsorbente per l' acqua.

7 – Le somministrazioni di zolfo al terreno seminato a frumento aumentano la produzione di questa coltura per quantitativi variabili da Q.li 0,5 a 4 per Ha. con un massimo corrispondente a 2 Q.li.

8 – Dovendosi naturalmente negare allo zolfo valore di sostanza concimante di utilizzazione diretta da parte delle piante superiori, nè potendosi fino ad ora ritenere che esso nelle limitate proporzioni impiegate abbia profonde ripercussioni sullo stato fisico del terreno, alla stregua dei risultati ottenuti nelle indagini di laboratorio, la spiegazione dei fatti accertati con le prove in vaso ed in campo, deve essere probabilmente ricercata *nei diretti rapporti che vengono a stabilirsi fra zolfo, prodotti della sua trasformazione parziale e microbi terricoli*. Mentre una parte più o meno considerevole e non ancora bene individuata della microflora contribuirebbe ad assicurare l' evoluzione dell' elemento verso forme di combinazione di natura acida, le attività microbiochimiche subirebbero, contemporaneamente, variazioni più o meno profonde per la presenza medesima dei suddetti composti, almeno fino a quando un ulteriore intervento microbico ed una conveniente neutralizzazione per opera delle basi del terreno non abbiano fatto scomparire, in tutto od in parte, tali prodotti di solubilizzazione dello zolfo.

Pisa, Facoltà di Agraria della R. Università
Istituto di Patologia vegetale e Microbiologia agraria

(Presentata il 22 giugno 1936 – XIV)

BIBLIOGRAFIA

1 – Filippo Re – *Saggio sui letami.* G. Silvestri, *Milano 1815.*
2 – Nathanson – Centbl. Bakt., 2, 1903.
3 – Beyerinck – Centb. Bakt., 2, 1904.
4 – F. J. Dymond, F. Hughes and C. W. C. Jupe – The Jorn. of Agric. Science, 1, 1905.
5 – A. D. Bernhard – Deutsche landw. Presse, 1910, pag. 204: 1911, pag. 168: 1812, pag. 273.
6 – E. Changrin et A. Destriot – Journ. d'Agric. prat., 1911, 1912, 1913.
7 – E. B. Hart ad W. H. Peterson – Agric. Exp. Stat. Wisconsin, Res. Bull. 14, 1911.
8 – V. V. Sabaschnikoff – Russ. Journ. für experim. Landw., 16, 1812.
9 – E. Boullanger – Compt. rend. de l'Ac. des Sciences, 154, 1912.
10 – E. Boullanger et M. Dugardin – Idem, 155 1912.
11 – A. Demolon – Compt. rend. de l'Ac. des Sciences, 154, 1912: 156, 1913: 173, 1921.
12 – Jacobsen – Folia Microb., 1 e 8, 1912.
13 – Lieske – Ber. Deut. Bot. Gesell., 30, 1912.
14 – A. Manaresi – L' Agricoltura moderna, 23, 1913.
15 – Tritschler – Deut. landw. Presse, 1913, pag. 231.
16 – H. von Feilitzen – Fühlings landw. Zeitung, 62, 1913.
17 – W. Tealau – Die landw. Vers. Stat., 82, 1913.
18 – Brioux et Guerbet – Compt. rend. des Séances de l'Ac. de France, 46, 1913.
19 – Brioux et Guerbet – Ann. de la Science Agron. franç. et étrang., 1913.
20 – V. Vermorel et E. Danthony – Journ. d' Agric. prat., 1913.
21 – O. M. Shedd – Kentucky Agric. Exp. Stat. Res. Bull. 188, 1914.
22 – Th. Pfeiffer und E. Blanck – Die landw. Vers. Stat., 83, 1914.
23 – W. O. Robinson – U. S, D. of Agric. Waschington, Bull. 122, 1914.
24 – H. Lint Clay – Journ. of Ind. and Engin. Chem., 6, 1914.
25 – E. B. Hart and W. Tottingham – Journ. Agric. Res., 5, 1915.
26 – G. Bosinelli – Staz. Sper. Agr. Ital., 48, 1915.
27 – Kappen und Quensell – Die landw. Vers. Stat., 86, 1915
28 – P. E. Brown and E. H. Kelloc – Journ. Amer. Soc. Agron., 7, 1915.
29 – Th. Pfeiffer uud W. Simmermacher – Fühlings landw. Zeitung., 64, 1915: 65, 1916.
30 – Zolla – Revue générale des sciences pures et appliquées, 26, 1915.
31 – Gehring – Centbl. Bakt., 2, 1915.
32 – W. Pitz – Journ. Agric. Res., 6 1916.
33 – J. W. Ames and G. E. Boltz – Agric. Exp. Stat. Ohio. Res. Bull. 292, 1916.
34 – J. Lipmann – Soil Science, 2, 1916.
35 – Schroeder – Journ. of Ind. and Engin. Chem., 8, 1916.
36 – G. R. Oparo – El Agricoltor, Sanhiago, 109, 1916.
37 – J. G. Lipmann, H. C. Mc. Lean and H. Lint – Soil Science, 1 e 2, 1916.
38 – J. G. Lipmann and H. C. Mc. Lean – Soil Science, 4, 1917.
39 – P. E. Brown and Gwinn – Agric. Exp. Stat. Jowa, Res. Bull. 43, 1917.
40 – P. E. Brown and H. W. Warner – Soil Science, 4, 1917.
41 – J. W. Ames and T. E. Richmond – Soil Science, 6, 1918.
42 – H. C. Mc. Lean – Soil Science, 5, 1918.

43 - F. C. Reiner and H. V. Tartar - Agric. Exp. Stat. Oregon, Res. Bull. 163, 1919.
44 - J. W. Ames and G. E. Boltz - Soil Science, 7, 1919.
45 - O' Gara - Exp. Stat. Record, 41, 1919.
46 - E. Avanzi - Boll. Ist. Agr. di Pisa, 13, 1919-1922.
47 - J. Chauzit - Bull. Agr. Alger., Tunis. et Maroc, 1919, pag. 295.
48 - Mc. Call and W. I. Smith - Journ. of Agric. Res., 19, 1920.
49 - J. G. Lipmann and J. S. Joffe - Soil Science, 10, 1920.
50 - O. M. Shedd - Journ. of Agric. Res., 18, 1920.
51 - W. E. Ellett and W. G. Harris - Soil Science, 10, 1920.
52 - R. Stewart - Agric. Exp. Stat. Jowa, Res. Bull. 227, 1920.
53 - G. Nicolas - Compt. rend. de l' Ac. des Sciences, 172, 1921.
54 - J. G. Lipmann, S. A. Waksmann and J. S. Joffe - Soil Science, 12, 1921.
55 - J. G. Lipmann, A. W. Blair, H. Martin and C. S. Beekwth - Soil Science, 11, 1921.
56 - S. A. Waksmann and J. S. Joffe - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 18, 1921.
57 - P. L. Hibbard - Soil Science, 11, 1921.
58 - J. G. Lipmann, A. L. Prince and A. W. Blair - Soil Science, 12, 1921.
59 - J. S. Joffe and H. C. Mc. Lean - Soil Science, 14, 1922.
60 - W. Rudolfs - Soil Science, 13, 1922.
61 - A. Selmann, S. A. Waksmann and J. S. Joffe - Jorn. of Biol. Chem., 50, 1922.
62 - S. A. Waksmann - Journ. of Bacter., 7, 1922.
63 - S. A. Vaksmann and J. S. Joffe - Journ. of. Bacter., 7, 1922.
64 - G. D' Ippolito - Staz. Sper. Agr. Ital., 56, 1923.
65 - S. A. Waksmann, J. S. Joffe and R. L. Starkey - Journ. of Agric. Res., 24, 1923.
66 - J. S. Joffe - Soil Science, 15, 1923.
67 - A. Kippel - Centb. Bakt., 2, 1924.
68 - Warburg - Science, 61, 1925.
69 - R. Perotti - *La teoria microrganica della concimazione*, Sapientia, Roma, 1926.
70 - W. L. Powers - Act. IV Congr. Int. de Pédologie, Roma, 1926.
71 - O. M. Shedd - Soil Science, 22, 1926.
72 - J. G. Lipmann and S. A. Waksmann - Act. IV Congr. Int. de Pédologie, Roma 3, 1926.
73 - J. M. Fife - Soil Science, 21, 1926.
74 - G. Guitonneau - Compt. rend. de l' Ac. des Sciences, 185, 1927.
75 - G. Bertrand el L. Silberstein - Compt. rend. de l'Ac. des Sciences, 184, 1927; 189, 1929.
76 - M. J. Bordas - Ann. de la Science Agr. franç. et étrang., 1928.
77 - K. Drewes - Centbl. Bakt., 76, 1928.
78 - G. Guitonneau - First Int. Congr. of Soil Science, Washington, 3, 1928.
79 - A. Demolon - Compt. rend. des séances de l' Ac. d' Agric. de France, 1928, pag. 676.
80 - R. Perotti e M. Valleggi - *Sulla dissoluzione ed utilizzazione microrganica della potassa leucitina*, 1929. Pubbl. N. 26 dei Lab. di Pat. e Batter. del R. Ist. Sup. Agr. di Pisa.
81 - C. La Rotonda - Ann. di Tecnica Agraria, 1, 1931.
82 - A. Demolon - *La dynamique du sol.* Dunod, Paris, 1932.
83 - R. Perotti - *Lezioni di Pat. veg. e Batt. agr.*, Vallerini, Pisa, IV *(1ª parte)* 1933.
84 - H. J. Webber - Agr. Exp. Stat. College of Agric. Berkeley, 1934.